

**Белик Алексей Анатольевич**



Младший научный сотрудник лаборатории химии ферментов Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН. В 2011 г. с отличием закончил учебу на кафедре биоорганической химии и биотехнологии Дальневосточного федерального университета по специальности «биоорганическая химия и биотехнология». Со второго курса начал работать по различным направлениям, связанными с полипептидными соединениями. Защитив дипломную работу, поступил в аспирантуру ТИБОХ ДВО РАН. Сейчас работает под руководством д.б.н. Михаила Игоревича Кусайкина.

Объект исследования – полисахариддеградирующие ферменты морских организмов: эндо-1,3-β-D-глюканазы и альгинатлиазы. Первая работа в данном направлении была связана с установлением первичной структуры и свойств эндо-1,3-β-D-глюканазы моллюска *Tapes literata*. На данный момент изучает ряд ферментов животного и бактериального происхождения (нативных и рекомбинантных).

УДК 577.151

А.А. БЕЛИК, А.О. ЗУЕВА

**Выделение, свойства  
и аминокислотные последовательности  
двух 1,3-β-D-глюканаз брюхоногого  
моллюска *Lambis* sp.**

*Были выделены и охарактеризованы две 1,3-β-D-глюканазы с молекулярными массами 44 и 51 кДа из гепатопанкреаса морского брюхоногого моллюска *Lambis* sp. из Южно-Китайского моря. Свойства этих двух ферментов оказались аналогичны эндо-1,3-β-D-глюканазам (КФ 3.2.1.39) моллюсков тропических морей:*

\*БЕЛИК Алексей Анатольевич – младший научный сотрудник, ЗУЕВА Анастасия Олеговна – старший лаборант (Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток).

\*E-mail: belik\_a\_a@mail.ru

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-04-00905.

температурный оптимум 60 °С, интервал pH от 3,0 до 6,0; Kт для гидролиза ламинарана 0,30–0,35 мг/мл. Основным продуктом исчерпывающего гидролиза в обоих случаях была глюкоза. Оба фермента катализировали гидролиз ламинарана с сохранением конфигурации аномерного атома углерода и образование продуктов трансгликозилирования со степенями полимеризации 2 и 3. Была установлена полная нуклеотидная последовательность кДНК, кодирующих данные 1,3-β-D-глюканазы. Ферменты были отнесены к 16-му структурному семейству O-гликозидгидролаз (GH16).

Ключевые слова: 1,3-β-D-глюканаза, гепатопанкреас, ламинаран, морской моллюск, *Lambis* sp., трансгликозилирование.

**Isolation, properties and amino acid sequences of two 1,3-β-D-glucanases from gastropoda *Lambis* sp.**  
A.A. BELIK, A.O. ZUEVA (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

*Two 1,3-β-D-glucanases from hepatopancreas of marine gastropoda Lambis sp. from the South China Sea with molecular weights of 44 and 51 kDa were isolated and characterized. The properties of these two enzymes appeared to be similar to endo-1,3-β-D-glucanases (EC 3.2.1.39) of tropical sea mollusks: temperature optimum was 60 °C, pH range was from 3.0 to 6.0, Km for laminaran hydrolysis was 0.30–0.35 mg/ml. In both cases, glucose was the main product of complete hydrolysis. The both enzymes catalyzed hydrolysis of laminaran with retention of configuration of anomeric carbon atom and formation of transglycosylation products with DP 2 and 3. There were determined full cDNA sequences, coding these 1,3-β-D-glucanases. Both enzymes were classified to O-glycoside hydrolase structural family 16 (GH16).*

*Key words: 1,3-β-D-glucanase, hepatopancreas, laminaran, marine mollusk, Lambis sp., transglycosylation.*

## Введение

β-1,3-глюканазы, или ламинариназы, широко распространены и найдены у бактерий, беспозвоночных, растений и грибов [14]. У бактерий и животных β-1,3-глюканазы выполняют главным образом пищеварительные функции, причем субстратная специфичность ламинариназ моллюсков коррелирует с особенностями рациона животных [9, 10, 16]. У животных, значительную часть рациона которых составляют грибы, наличие β-1,3-глюканаз в качестве пищеварительного фермента может выступать в качестве защиты против грибкового заражения [3]. У растений эти ферменты участвуют в защите от патогенных грибов [4, 17].

Хотя реакцию гидролиза катализируют все 1,3-β-D-глюканазы, бактериальные и животные ферменты относят к 16-му семейству гликозидгидролаз (GH16), а растительные – к 17-му (GH17), ввиду различий в их аминокислотных последовательностях [6–8]. Семейство 16 гликозидгидролаз является одним из самых полиспецифичных и насчитывает 14 типов ферментативной активности (<http://www.cazy.org/GH16.html>). Таким образом, для полного описания фермента необходимо знать как его структурные, так и функциональные характеристики.

В настоящее время лучше изучены 1,3-β-D-глюканазы растений, дрожжей, бактерий и грибов (140 видов). В царстве животных известно всего 16 функционально охарактеризованных 1,3-β-D-глюканаз: 2 из насекомых и 14 из морских гидробионтов.

Несмотря на различия в субстратной специфичности, все представители 16-го семейства гликозидгидролаз имеют схожую пространственную структуру и одинаковый механизм действия. Предполагают, что они имеют общего эволюционного предшественника, но сильно дивергировали в направлении приобретения новой специфичности [12].

Имеется большое число примеров промышленного применения эндо-1,3-β-D-глюканаз: в пивоваренной и кормовой промышленности, в коммерческом производстве дрожжевого экстракта, конверсии водорослевой биомассы в ферментируемые сахара и др. В то же время, благодаря особенной роли β-1,3-глюканов в формировании стенок клеток грибов, эти ферменты находят и специализированное применение [1; 5; 15, р. 349]. Потенциал практического использования β-1,3-глюканаз лишь начинает раскрываться.

В данной работе были охарактеризованы нативные β-1,3-глюканазы, обнаруженные в тропическом морском брюхоногом моллюске *Lambis* sp.

## Материалы и методы исследования

**Объект исследования.** Морской моллюск *Lambis* sp. был собран в Южно-Китайском море в прибрежной зоне Социалистической Республики Вьетнам в декабре 2016 г. Гепатопанкреас был немедленно извлечен, лиофильно высушен, далее он хранился в замороженном виде.

**Реактивы.** Ламиран был выделен из бурой водоросли *Saccharina cichorioides* [18]. Прочие субстраты, сорбенты для хроматографии, 4-метилумбеллиферил- $\beta$ -D-глюкопиранозид, неорганические соли – коммерческие препараты фирм Sigma-Aldrich (США) и «Реахим» (Россия).

**Выделение и очистка 1,3- $\beta$ -D-глюканаз моллюска *Lambis* sp.** Лиофилизированный гепатопанкреас (1 г) гомогенизировали в 25 мл охлажденного 0,2 М Na-сукцинатного буфера, pH 5,5. Гомогенат выдерживали 1 ч при 4 °С, а затем центрифугировали 20 мин при 9000 g. К супернатанту добавляли сухой сульфат аммония до концентрации 2 М, выдерживали 1 ч при 4 °С, а затем снова центрифугировали 20 мин при 9000 g. Супернатант наносили на колонку с фенил-сефарозой CL-4B (5 мл), уравновешенную 0,2 М Na-сукцинатным буфером с добавлением сульфата аммония до концентрации 2 М, и проводили его хроматографию в градиенте концентрации сульфата аммония от 2,0 до 0,0 М. Фракции объединяли согласно изменению поглощения при 280 нм, диализовали против 0,025 М Na-сукцинатного буфера pH 5,5 и тестировали активность. Активные фракции, элюированные при концентрациях сульфата аммония приблизительно 0,3 и 0,0 М, диализовали, наносили на колонки с КМ-целлюлозой (5 мл), уравновешенные 0,025 М Na-сукцинатным буфером pH 5,5, и проводили хроматографию в градиенте концентраций NaCl от 0,0 до 1,0 М. Наиболее активные фракции были гомогенными по данным SDS-PAGE электрофореза и были охарактеризованы как 1,3- $\beta$ -D-глюканазы GLS1 и GLS2.

**Определение активности 1,3- $\beta$ -D-глюканаз.** Стандартная реакционная смесь содержала 200 мкл раствора ламирана (1 мг/мл) в 0,025 М Na-сукцинатном буфере pH 3,0 для GLS1 или pH 4,0 для GLS2 (далее – рабочий буфер) и 20 мкл раствора фермента. Время инкубации 30 мин при 37 °С. Активность определяли по увеличению в реакционной смеси количества восстанавливающих сахаров методом Нельсона [13]. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмолья глюкозы в минуту. Удельную активность выражали как е.а./мг белка.

**Концентрацию белка** в растворах определяли методом Брэдфорда [2], в процессе хроматографии – по поглощению при 280 нм.

**Электрофорез белков** в денатурирующих условиях проводили в 12%-ном ПААГ [11]. В качестве стандартов использовали смеси белков Bio-Rad (США) с молекулярными массами от 15 до 250 кДа.

**Определение оптимума pH.** Реакционную смесь, содержащую 20 мкл раствора фермента, 100 мкл 0,2 М цитрат-фосфатного буфера с различными значениями pH (от 2,0 до 9,0) и 400 мкл водного раствора ламирана (1 мг/мл), инкубировали 30 мин при 37 °С. Затем в пробах определяли восстанавливающую способность [13].

**Определение pH-стабильности.** 50 мкл раствора фермента в 0,05 М цитрат-фосфатном буфере требуемого значения pH выдерживали при комнатной температуре 30 мин, затем добавляли 200 мкл субстрата в 0,2 М рабочем буфере и определяли остаточную активность фермента.

**Определение температурного оптимума.** Стандартную смесь фермента и ламирана инкубировали 30 мин при различных температурах от 4 до 90 °С, затем определяли в пробах восстанавливающую способность [13].

**Определение термостабильности.** По 500 мкл раствора фермента в рабочем буфере выдерживали при различных температурах (от 20 до 90 °С). Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты раствора фермента (20 мкл). Затем в охлажденные

пробы добавляли 200 мкл раствора ламинарана (1 мг/мл), инкубировали 30 мин при 37 °С и определяли остаточную активность фермента.

**Действие на различные субстраты.** Реакционная смесь содержала 20 мкл раствора фермента в рабочем буфере (0,01 е.а.) и 200 мкл раствора субстрата (1 мг/мл). Инкубирование фермента с ламинараном и периодатно-окисленным ламинараном проводили 30 мин, с другими субстратами – от 3 до 24 ч. Скорости гидролиза различных субстратов выражали в процентах относительно скорости расщепления ламинарана.

Константа Михаэлиса ( $K_m$ ) для гидролиза ламинарана была рассчитана по методу Лайнуивера–Берка. Измеряли начальные скорости гидролиза ламинарана (концентрации от 0,1 до 10 мг/мл) очищенной 1,3-β-D-глюканазой (0,01 е.а.) в стандартных условиях.

**Получение продуктов гидролиза и трансгликозилирования.** К 400 мкл раствора ламинарана (1 мг/мл) добавляли 100 мкл (0,02 е.а.) раствора фермента и инкубировали при 37 °С. Через определенные промежутки времени отбирали пробы по 50 мкл, реакцию останавливали кипячением. Анализ продуктов проводили с помощью гель-фильтрации (ВЭЖХ) на колонке Shodex SB401-4E при 70 °С.

Для получения продуктов трансгликозилирования к 1 мл раствора, содержащего 2 мг ламинарана и 2 мг 4-метилумбеллиферил-β-D-глюкопиранозида, добавляли 50 мкл (0,01 е.а.) фермента в соответствующем буфере. Инкубировали при 37 °С. Через определенные промежутки времени отбирали аликвоты по 50 мкл, реакцию останавливали кипячением. Анализ продуктов проводили с помощью ТСХ на пластинках «Сорбфил» в системе бутанол – уксусная кислота – вода (3 : 1 : 1).

**ЯМР-спектроскопия.** <sup>1</sup>H ЯМР-спектры записывали на приборе DRX 500 (Bruker, ФРГ). Ламинаран несколько раз упаривали с D<sub>2</sub>O. Затем растворяли его в D<sub>2</sub>O (0,5 мл, 10 мг/мл) и записывали спектр. К раствору ламинарана добавляли фермент (0,1 мл, 0,1 е.а.) в соответствующем буфере (см. выше) на основе D<sub>2</sub>O, инкубировали в течение 1 ч при 37 °С и снимали спектры (64 скана).

**Установление аминокислотных последовательностей.** Серединный фрагмент 1,3-β-D-глюканазы (общий для обоих ферментов) был получен методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием в качестве матриц кДНК гепатопанкреаса моллюска. Для амплификации фрагмента были использованы праймеры на высококонсервативные пептиды: WPAIWM, GEIDIME, NVAVGG и PFDKPF. Концевые фрагменты были получены методом быстрой амплификации концевых фрагментов кДНК (RACE). Сопоставлением структур серединных и соответствующих концевых фрагментов были установлены полные нуклеотидные последовательности кДНК, кодирующих две 1,3-β-D-глюканазы.

**Выделение РНК.** Суммарную РНК из гепатопанкреаса *Lambis* sp. выделяли с помощью набора GeneJET RNA Purification Kit K0731 (Fermentas, Литва) согласно прилагаемой методике.

**Синтез и амплификация кДНК.** кДНК-библиотеки гепатопанкреаса моллюска были получены с использованием SMART PCR cDNA Synthesis Kit (Clontech Laboratories Inc., США) согласно рекомендациям изготовителя.

**Клонирование ДНК.** Для клонирования ПЦР-фрагментов использовали InsT/Aclone™ PCR Product Cloning Kit (Fermentas, Литва) согласно инструкции изготовителя.

**Выделение плазмидной ДНК из *E. coli*** осуществляли модифицированным методом щелочного лизиса.

**Секвенирование ДНК.** Нуклеотидные последовательности установлены на автоматическом секвенаторе 310 (ABI PRISM, США) с помощью набора Big Dye 3.1 (Applied Biosystems, США) согласно рекомендациям производителя.

**Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей.** Нуклеотидные и аминокислотные последовательности анализировали с помощью программ Gene Runner, Chromas, Sequence Scanner. Поиск гомологичных аминокислотных последовательностей

осуществляли с помощью сервера BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Множественное выравнивание аминокислотных и нуклеотидных последовательностей проводили с помощью программы Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

## Результаты и обсуждение

Выделенные ферменты по данным ДСН-ПААГ электрофореза имели молекулярные массы 45 кДа (GLS1) и 51 кДа (GLS2) (рис. 1), что является типичными значениями для ламинариаз морских беспозвоночных [14]. Удельные активности очищенных препаратов – 4,5 ед./мг для GLS1 и 6,8 ед./мг для GLS2. Оптимум pH составил 3,0 для GLS1 и 4,0 для GLS2 (рис. 2а). Ферменты более суток сохраняли свою активность при pH от 3,0 до 6,0. Температурный оптимум для обоих ферментов составил 60 °С, при этом интервал активности для GLS1 оказался более узким, чем для GLS2 (рис. 2б). Оба фермента сохраняли свою стабильность при 30 °С в течение суток, при 45 °С время полуинактивации составило 116 мин для GLS1 и 180 мин для GLS2. Полная инактивация GLS1 происходила за 20 мин при 75 °С, а GLS2 – при 90 °С.

Одной из основных характеристик ферментов является их сродство к субстрату, что характеризуется константой Михаэлиса. По методу Лайнуивера–Берка с использованием ламинарана в качестве субстрата были определены  $K_m$ , которые составили 0,35 и 0,30 мг/мл для GLS1 и GLS2 соответственно, что характерно для ламинариаз морских беспозвоночных. Анализ кинетики накопления продуктов гидролиза показал, что при действии обоих ферментов на ламинаран сначала образуются ламинаритриоза и гентиобиоза, однако затем глюкоза становится основным продуктом (рис. 3). Это отличает полученные нами ферменты от других ламинариаз морских беспозвоночных, где конечными продуктами являлись олигосахариды различной степени полимеризации и глюкоза. Образование и накопление гентиобиозы в продуктах гидролиза ламинарана связано с тем, что исследуемые

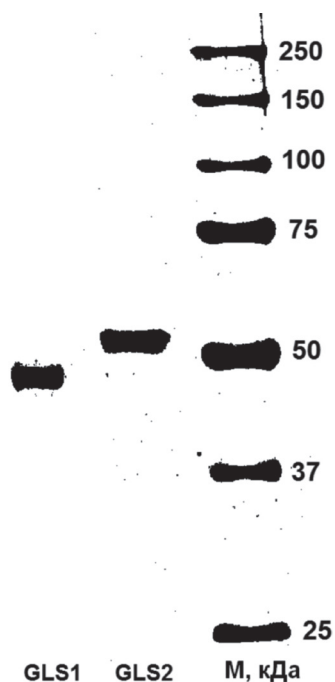


Рис. 1. Определение молекулярной массы ферментов GLS1 и GLS2 методом SDS PAGE электрофореза

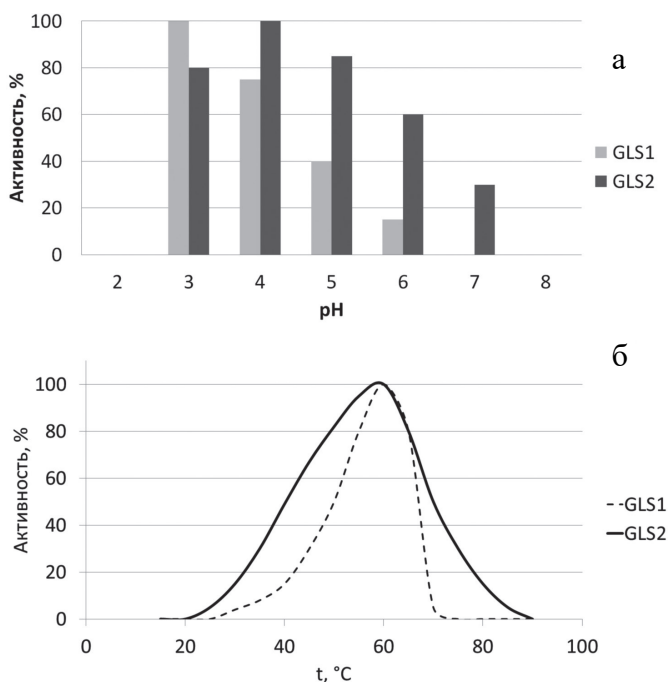


Рис. 2. Оптимум pH (а) и температуры (б) ферментов GLS1 и GLS2

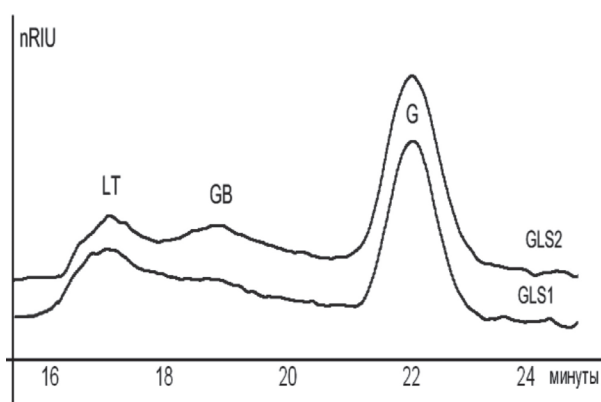


Рис. 3. ВЭЖХ анализа конечных продуктов гидролиза ламинарана эндо-1,3-β-D-глюканазами GLS1 и GLS2. G – глюкоза, GB – гентиобиоза, LT – ламинаритриоза

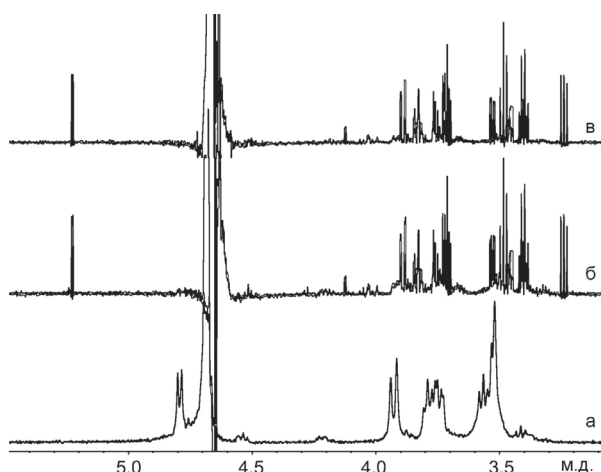


Рис. 4. <sup>1</sup>H ЯМР спектры исходного ламинарана (а), продуктов его исчерпывающего гидролиза при помощи GLS1 (б) и GLS2 (в)

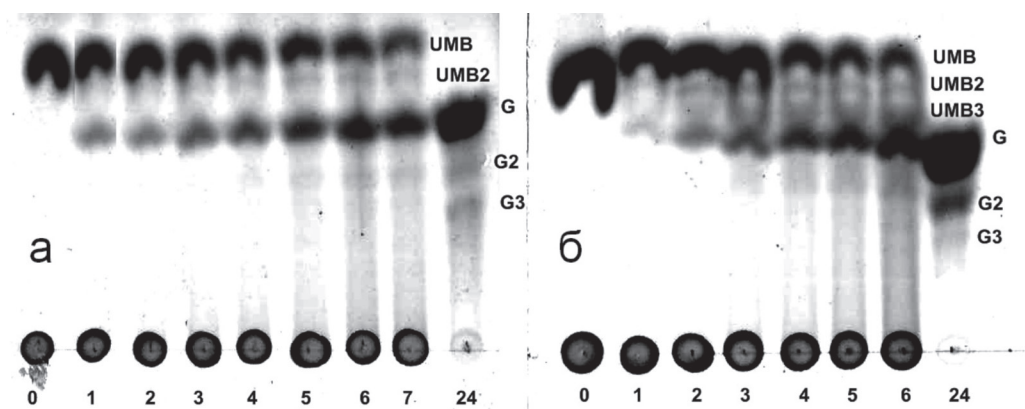


Рис. 5. ТСХ анализ продуктов трансгликозилирования 4-метилумбеллиферилглюкопиранозид молекулами глюкозы и ламинариолигосахаридов под действием GLS1 (а) и GLS2 (б). UMB – 4-метилумбеллиферилглюкопиранозид, UMB2 – 4-метилумбеллиферилдисахарид, UMB3 – 4-метилумбеллиферилтрисахарид, G – глюкоза, G2 – ламинарибиоза, G3 – ламинаритриоза. Цифрами указано время (ч) от начала реакции

ферменты не могут расщеплять β-1,6-гликозидные связи между остатками глюкозы. Расщепление β-1,3-гликозидных связей подтверждается данными ЯМР-спектроскопии. <sup>1</sup>H ЯМР спектры ламинарана содержали характерный сигнал при 4,8 м.д., соответствующий <sup>1</sup>H остатков глюкозы, связанных β-1,3-гликозидными связями. В спектре продуктов реакции этот сигнал отсутствует, что говорит о расщеплении β-1,3-связей (рис. 4).

Почти все известные ламинарины морских беспозвоночных обладают способностью не только гидролизовать гликозидные связи, но и синтезировать их в результате реакции трансгликозилирования. Анализ продуктов трансгликозилирования методом ТСХ показал, что, помимо основных процессов – расщепления 4-метилумбеллиферилглюкопиранозид и накопления глюкозы, происходит образование меченых олигосахаридов со степенями полимеризации 2 и 3 (рис. 5).

Установленные аминокислотные последовательности полученных ферментов имеют длину 389 а.о. (GLS1, номер GenBank A1Y63535.1) и 451 а.о. (GLS2,





**Особенности аминокислотного состава и температурная стабильность  
эндо-1,3-β-D-глюканаз беспозвоночных**

Вид	Число остатков цистеина	Число аминокислотных остатков	Молекулярная масса, кДа	Температурный оптимум, °С	Температура инактивации за 30 мин, °С
<i>Lambis</i> sp. GLS1	5	389	44,4	60	75
<i>Lambis</i> sp. GLS2	5	451	50,7	60	90
<i>Haliotis discus hannai</i>	3	366	41,0	50	50
<i>Tapes literata</i>	4	442	49,9	45	60
<i>Pseudocardium sachalinense</i>	4	444	50,6	50	55
<i>Littorina sitkana</i>	3	442	49,8	40	45
<i>Chlamys albidus</i>	3	339	38,5	37	37
<i>Patinopecten yessoensis</i>	3	339	38,5	45	50
<i>Perna viridis</i>	7	443	50,3	45	50
<i>Spodoptera frugiperda</i>	4	375	42,0	45	52
<i>Tenebrio molitor</i>	6	379	42,5	30	37
<i>Cryptopygus antarcticus</i>	3	270	31,0	50	55
<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	4	251	30,0	65	70

номер GenBank AIY63536.1), что согласуется с молекулярными массами выделенных белков. Анализ полученных последовательностей показал, что оба фермента относятся к 16-му семейству O-гликозидгидролаз.

Степень идентичности между двумя 1,3-β-D-глюканазами из *Lambis* sp. составляет 48 %, гомологии – 62 %. Гомология с эндо-1,3-β-D-глюканазами других моллюсков – 49–61 %, других беспозвоночных – 40–53 %. Теоретически рассчитанные изоэлектрические точки составляют 6,68 для GLS1 и 6,94 для GLS2, что может объяснять смещение рН оптимумов ферментов в область низких значений по сравнению с другими β-1,3-глюканазами морских беспозвоночных.

Сравнительный анализ показал, что наиболее консервативным является фрагмент GE(I/M)DXXE (X – гидрофобный аминокислотный остаток), представляющий собой активный центр O-гликозидгидролаз 16-го семейства (рис. 6). Как было показано ранее, два остатка глутаминовой кислоты принимают непосредственное участие в катализе. Консервативной является также последовательность WPAXWML, являющаяся участком связывания субстрата (CCC).

В целом консервативными являются остатки триптофана Trp188, Trp194 и Trp205 (здесь и далее нумерация по GLS1), хотя в GLS2 Trp205 заменен на глицин.

Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей эндо-1,3-β-D-глюканаз беспозвоночных выявило также наличие двух консервативных остатков гистидина – His240 и His268, что позволяет предположить их важную роль для активности ферментов, хотя у GLS1 наблюдается замена His240 на валин. В последовательностях обеих 1,3-β-D-глюканаз обнаруживается по 5 остатков цистеина, однако только один из них, Cys145, является консервативным для всех эндо-1,3-β-D-глюканаз морских моллюсков и некоторых других беспозвоночных. Эндо-1,3-β-D-глюканазы *Chlamys albidus* и *Patinopecten yessoensis* имеют по 3 остатка цистеина, *Tapes literata* – 4, *Pseudocardium sachalinense* – 4, *Perna viridis* – 7 (см. таблицу). Таким образом, высокая термостабильность обоих ферментов может объясняться образованием дисульфидных мостиков.

Итак, два фермента, выделенные из гепатопанкреаса морского брюхоногого моллюска *Lambis* sp., охарактеризованы как 1,3-β-D-глюканазы 16-го семейства O-гликозидгидролаз, обладают умеренной удельной активностью, относительно высокой термостабильностью и, предположительно, являются ферментами эндотипа действия (КФ 3.2.1.39).



## ЛИТЕРАТУРА

1. Bagal-Kestwal D., Kestwal R.M., Hsieh B.C., Chen R.L.C., Cheng T.J., Chiang B.H. Electrochemical  $\beta(1\rightarrow3)$ -d-glucan biosensors fabricated by immobilization of enzymes with gold nanoparticles on platinum electrode // *Biosens. Bioelectron.* 2010. Vol. 26, N 1. P. 118–125.
2. Bradford M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72, N 1/2. P. 248–254.
3. Bragatto I., Genta F.A., Ribeiro A.F., Terra W.R., Ferreira C. Characterization of a  $\beta$ -1,3-glucanase active in the alkaline midgut of *Spodoptera frugiperda* larvae and its relation to  $\beta$ -glucan-binding proteins // *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 2010. Vol. 40, N 12. P. 861–872.
4. Castresana C., de Carvalho F., Gheysen G., Habets M., Inze D., Van Montagu M. Tissue-specific and pathogen-induced regulation of a *Nicotiana plumbaginifolia* beta-1,3-glucanase gene // *Plant Cell.* 1990. Vol. 2, N 12. P. 1131–1143.
5. De Marco J.L., Felix C.R. Purification and characterization of a  $\beta$ -glucanase produced by *Trichoderma harzianum* showing biocontrol potential // *Braz. Arch. Biol. Technol.* 2007. Vol. 50, N 1. P. 21–29.
6. Henrissat B. A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities // *Biochem. J.* 1991. Vol. 280 (2). P. 309–316.
7. Henrissat B., Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities // *Biochem. J.* 1993. Vol. 293 (3). P. 781–788.
8. Hong T.Y., Cheng C.W., Huang J.W., Meng M.S. Isolation and biochemical characterization of an endo-1,3- $\beta$ -glucanase from *Streptomyces sioyaensis* containing a C-terminal family 6 carbohydrate-binding module that binds to 1,3- $\beta$ -glucan // *Microbiology (SGM)*. 2002. Vol. 148. P. 1151–1159.
9. Kumagai Y., Ojima T. Enzymatic properties and the primary structure of a  $\beta$ -1,3-glucanase from the digestive fluid of the Pacific abalone *Haliotis discus hannai* // *Comp. Biochem. Phys. B.* 2009. Vol. 154, N 1. P. 113–120.
10. Kumagai Y., Ojima T. Isolation and characterization of two types of  $\beta$ -1,3-glucanases from the common sea hare *Aplysia kurodai* // *Comp. Biochem. Phys. B.* 2010. Vol. 155, N 2. P. 138–144.
11. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. Vol. 227 (5259). P. 680–685.
12. Michel G., Chantalat L., Duee E., Barbeyron T., Henrissat B., Kloareg B., Dideberg O. The  $\kappa$ -carrageenase of *P. carrageenovora* features a tunnel-shaped active site: a novel insight in the evolution of clan-B glycoside hydrolases // *Structure.* 2001. Vol. 9, N 6. P. 513–525.
13. Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose // *J. Biol. Chem.* 1944. Vol. 153. P. 375–380.
14. Sova V.V., Pesentseva M.S., Zakharenko A.M., Kovalchuk S.N., Zvyagintseva T.N. Glycosidases of marine organisms // *Biochemistry (Moscow)*. 2013. Vol. 78, N 7. P. 746–759.
15. Trincone A. Marine enzymes for biocatalysis: sources, biocatalytic characteristics and bioprocesses of marine enzymes. Woodhead Publ. Ltd, 2013. 514 p. (Woodhead Publishing Series in Biomedicine; N 38).
16. Vekhova E.E., Kusaykin M.I., Kiselev K.V. Activity of 1,3- $\beta$ -D-Glucanases and Expression of *CG-GLU1* in the Mussel *Crenomytilus grayanus* (Bivalvia) in Three Bays of the Sea of Japan // *Achiev. Life Sci.* 2015. Vol. 9, N 1. P. 69–77.
17. Yi S.Y., Hwang B.K. Purification and antifungal activity of a basic 34 kDa  $\beta$ -1,3-glucanase from soybean hypocotyls inoculated with *Phytophthora sojae* f. sp. *glycines* // *Mol. Cells.* 1997. Vol. 7, N 3. P. 408–413.
18. Zvyagintseva T.N., Shevchenko N.M., Popivnich I.B., Isakov V.V., Scobun A.S., Sundukova E.V., Elyakova L.A. A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds // *Carbohydr. Res.* 1999. Vol. 322, N 1/2. P. 32–39.